

FGF-2 による機能的血管新生における非内皮間葉系細胞由来 MCP-1 に関する研究

分担研究者 居石 克夫 九州大学大学院医学研究院・教授

研究要旨

本研究では、塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）依存性機能的血管新生誘導過程における inflammatory/arteriogenesis 経路に關与する Monocyte chemoattractant protein-1（MCP-1）の役割について検討を行っている。虚血下肢、FGF-2 遺伝子導入により発現亢進を認める MCP-1 は、内因性の MCP-1 の作用を阻害することにより血流の回復が抑制されることから、機能的血管新生に必須であると考えられた。また FGF-2 は非内皮間葉系細胞を利用して VEGF、および MCP-1 の発現を独立して制御し、機能的血管新生に寄与していることが明らかとなった。

A. 研究目的

血管新生の過程には炎症反応が寄与するが、詳細な機構は明らかではない。MCP-1 は、単球/マクロファージの遊走、浸潤を制御するケモカインであり、また強力な arteriogenic factor である。我々は、重症虚血下肢への FGF-2 遺伝子治療の有効性における内因性血管新生因子群の階層的制御機構の重要性を明らかにしてきており、本研究はこの FGF-2 による機能的血管新生における MCP-1 の役割について検討を行った。

B. 研究方法

in vivo では、マウス虚血肢モデルに対し SeV-FGF-2 を筋注し内因性 MCP-1 発現の経時的変化を ELISA 法にて定量化した。また内因性 MCP-1 の作用を阻害するため dominant negative mutant 遺伝子（7ND MCP-1）を遺伝子導入、または MCP-1 受容体の CCR2 欠損マウスにおける血流回復をレーザードップラーにて測定した。*in vitro* では、血管内皮細胞（HUVEC、HPAEC）、線維芽細胞（MRC5）、血管平滑筋細胞（HSMC）、単球系細胞（THP-1）を各種リコンビナント蛋白で刺激、シグナル阻害剤処置し、MCP-1 発現を ELISA 法で定量化した。

（倫理面への配慮）

本研究は九州大学組み換え DNA 実験委員会の承認のもと P2 動物実験室で施行した。動物実験は九州大学動物実験委員会の審査、許可を得た。

C. 研究結果

虚血肢モデルでは早期に MCP-1 が誘導され、FGF-2 遺伝子導入により発現がさらに亢進した。FGF-2 依存性の下肢血流回復は 7ND

MCP-1 遺伝子導入により阻害され、CCR2 欠損マウスでは、下肢虚血耐性と FGF-2 依存性血行回復反応の低下を認めた。*In vitro* において TNF- α 依存性の MCP-1 発現亢進はいずれの細胞腫でも認められたが、FGF-2 依存性 MCP-1 発現亢進は、非内皮間葉系細胞にのみ認められた。また *in vivo*、*in vitro* 双方において VEGF、MCP-1 発現に相互作用を認めず、各種シグナル阻害剤を用いた検討では、FGF-2 依存性 MCP-1 発現は主に PKC、MEK 経路が關与しており、p70S6K を介する VEGF 発現システムと独立していた。

D. 考察 E. 結論

内因性 MCP-1/CCR2 システムは FGF-2 による機能的血管新生に必須であると考えられ、FGF-2 は非内皮間葉系細胞を利用して angiogenesis に關与する VEGF、および inflammatory/arteriogenesis 経路に關与する MCP-1 を独立して制御し、機能的血管新生に寄与していると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表（2006 年度）

1. Tanii M, Yonemitsu Y, Fujii T, Shikada Y, Kohno R, Onimaru M, Okano S, Inoue M, Hasegawa M, Onohara T, Maehara Y, Sueishi K. Diabetic microangiopathy in ischemic limb is a disease of disturbance of the platelet-derived growth factor-BB/protein kinase C axis but not of impaired expression of angiogenic factors. *Circ Res*. 2006 6;98(1):55-62.
2. Kaneko K, Yonemitsu Y, Fujii T, Onimaru M, Jin CH, Inoue M, Hasegawa M, Onohara T, Maehara Y, Sueishi K. A free radical scavenger but not FGF-2-mediated angiogenic therapy rescues

myoneuropathic metabolic syndrome in severe hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 290(4):H1484-92.

3. Sumiyoshi S, Nakashima Y, Chen YX, Itabe H, Sueishi K. Interleukin-10 expression is positively correlated with oxidized LDL deposition and inversely with T-lymphocyte infiltration in atherosclerotic intimas of human coronary arteries. *Pathol Res Pract.* 2006;202(3):141-50.
4. Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, Tani M, Nakano T, Egashira K, Takehara T, Inoue M, Hasegawa M, Kuwano H, Sueishi K. Nonendothelial mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularization: critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 26(11):2483-9.
2. 学会発表
1. 鬼丸満穂、米満吉和、藤井孝明、居石克夫 血管内皮細胞の Angiopoietin(Ang)-2 発現における Ang-1/Tie-2 シグナルの役割 第14回日本血管生物医学学会 2006年12月13日~15日 東京
2. 藤井孝明、米満吉和、鬼丸満穂、居石克夫 糖尿病性血管障害マウス虚血下肢のスタチン投与による血流改善効果 第14回日本血管生物医学学会 2006年12月13日~15日 東京
3. Okano S, Kondo H, Yonemitsu Y, Inoue M, Hasegawa M, Sueishi K The roles of CD4 T-cells in tumor immunotherapy using Sendai viral vector (SeV)-transfected dendritic cells (DC) 第36回日本免疫学会総会・学術集会 2006年12月11日~13日 大阪
4. 近藤晴彦、岡野慎士、米満吉和、居石克夫 B16メラノーマ移植マウスモデルにおける同種異系樹状細胞による抗腫瘍効果の検討 第36回日本免疫学会総会・学術集会 2006年12月11日~13日 大阪
5. Sueishi K Toward the recognition of the pathophysiological role of plaque instability
6. 第6回日本心血管カテーテル治療学会学術集会 2006年11月23日~25日 広島
7. 藤井孝明、米満吉和、鬼丸満穂、居石克夫 FGF-2による機能的血管新生における内因性 VEGF、PlGF 連携の検討 第29回日本血栓止血学会学術集会 2006年11月16日~18日 栃木
8. 鬼丸満穂、米満吉和、藤井孝明、居石克夫 血管内皮細胞の Angiopoietin(Ang)-2 発現における Ang-1/Tie-2 シグナルの役割 第29回日本血栓止血学会学術集会 2006年11月16日~18日 栃木
9. 藤井孝明、米満吉和、鬼丸満穂、居石克夫

マウス下肢虚血に対する FGF-2 遺伝子治療における内因性 VEGF、PlGF の検討 第47回日本脈管学会総会 2006年10月20日~22日 神戸

10. 中野敏昭、米満吉和、岡野慎士、居石克夫 血管新生因子 VEGF family による動脈硬化進展に関する病態学的研究 第47回日本脈管学会総会 2006年10月20日~22日 神戸
11. 鬼丸満穂、米満吉和、藤井孝明、居石克夫 血管内皮細胞の Angiopoietin(Ang)-2 発現における Ang-1/Tie-2 シグナルの役割 第47回日本脈管学会総会 2006年10月20日~22日 神戸
12. 藤井孝明、住吉真治、古賀孝臣、西坂真里、居石克夫 心タンポナーゼを呈し、大動脈炎との鑑別を要した大動脈弁輪拡張症の1剖検例 第11回血管病理研究会 2006年10月14日 東京
13. Sueishi K Atherosclerosis as an inflammatory process -The pathophysiological implication of angiogenesis in atherosclerosis progression- The 8th Biennial APECSA Congress 2006年8月28日~30日 Tanzania
14. 藤井孝明、米満吉和、鬼丸満穂、居石克夫 FGF-2 誘導機能的血管新生における内因性 VEGF・PlGF 連携の検討 第38回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2006年7月13日~14日 東京
15. 中野敏昭、米満吉和、居石克夫 血管新生関連因子 VEGF-A、VEGF-C の動脈硬化進展に関する病態学的研究 第38回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2006年7月13日~14日 東京
16. 竜田恭介、田尻達郎、岡野慎士、柴田智子、井上誠、長谷川護、米満吉和、居石克夫、田口智章 センダイウイルスにより活性化された樹状細胞による抗腫瘍免疫治療の開発(続報) 第43回日本小児外科学会総会 2006年6月7日~9日 秋田
17. 松浦理城、鬼丸満穂、米満吉和、藤井孝明、中野敏昭、白砂兼光、居石克夫 口腔扁平上皮癌における VEGF-C/VEGFR3(FLT-4) オートクラインループの病態学的意義 第95回日本病理学会総会 2006年4月30日~5月2日 東京
18. 鬼丸満穂、米満吉和、谷井貢、中野敏昭、向野利一郎、藤井孝明、居石克夫 マウス虚血下肢への FGF-2 遺伝子導入における VEGF-C/FLT-4 関連ならびに PDGF-BB/PDGFR-β 連携のパラクライン的相互作用 第95回日本病理学会総会 2006年4月30日~5月2日 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

誘導型血管炎マウスにおける活性化好中球の関与

分担研究者 鈴木和男 国立感染症研究所・生物活性物質部 室長

研究協力者:高橋 啓(東邦大・大橋病院・病理)

協力者:大川原明子(国立感染症研究所・生物活性物質部)

大野尚仁(東京薬科大学・薬学部)

長尾朋和(国立感染症研究所・生物活性物質部)

研究要旨：MPO-ANCA 関連血管炎においては、MPO-ANCA および CRP、白血球の上昇に加え、活性化好中球が深くかかわっていることが明らかにされている。本年度は、MPO-ANCA による血管傷害に機構をマウス糸球体由来の血管内皮細胞初代培養 (mGEC)により解析した。anti-mMPO 抗体は、mGEC の ICAM-1 発現と KC ケモカインの産生増加を誘発し、抗原である MPO と無関係に内皮細胞に反応することが明らかになった。anti-mMPO と活性化好中球の刺激により ICAM-1 および KC の産生量は増加し、活性酸素産生阻害により ICAM-1 および KC 産生量は減少した。これらの結果から、血管炎の発症は、MPO-ANCA が、好中球への作用に加え、直接血管内皮細胞にも結合して ICAM-1 の発現を上昇させ、KC ケモカインを放出し、血管内皮細胞傷害がおこり血管炎誘導へと進展すると推定される。

血管炎の発症の要因には、活性化した好中球が関与していると推定され(Arimura, Y., et al. Clinical Nephrology 40, 256-264, 1993, A. I-Okawara, et al Nephrol., Dial. Transplant. 9:1708-1715, 2004)、好中球抗体 MPO-ANCA の抗原である Myeloperoxidase (MPO)、補体やその他の活性化分子が好中球活性が深く関与している(Ishida-Okawara, et al., Exp. Mol. Pathol. in press.)。一方、昨年度報告したように活性化好中球の CD69 分子もあることから、好中球の活性化に伴って好中球表面に表出する MPO に加え CD69 のかかわりも重要であることを示した。

そこで、本年度は、MPO 抗体による血管炎誘導初期の血管内皮細胞傷害度合いをを解析した。これにより、血管炎の誘導初期から血管

炎発症にいたるイベントにかかわる因子を明らかにすることとした。具体的には、マウス糸球体から得た血管内皮細胞の初代培養を用いて、活性化好中球の糸球体内皮細胞(mGEC)への MPO 抗体の作用を解析した。

B. 研究方法

1. mGEC の初代培養:

mGEC の初代培養は、C57BL/6N マウスの腎臓皮質をコラゲナーゼ処理により単一細胞を得、抗マウス CD31 抗体により内皮細胞を特定した。(図 1)

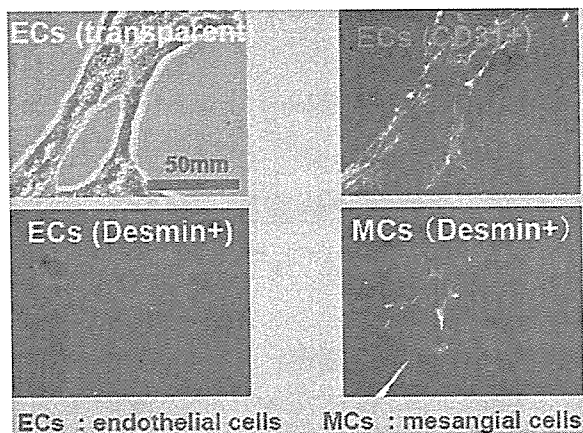


図1. mGECの初代培養細胞の特定:

2. MPO-ANCAによる内皮障害解析:

血管内皮接着分子(ICAM-1)の発現を解析した。

3. ICAM-1の発現:

ICAM-1のmRNAの発現は、RT-PCR法、細胞表面へのタンパクの発現を細胞ELISA法により定量し、間接抗体法により細胞を可視化した。

4. サイトカイン定量:

MPO-ANCAによる内皮細胞障害に関与するサイトカインを18種類サイトカインの定量により特定した。

5. 活性化好中球による内皮障害:

また、MPO-ANCAと活性化好中球による内皮障害についても検討し、その活性酸素の関与は、N-acetylcysteine(NAC)の抑制により特定した。

6. MPOの関与:

MPO-KOから血管内皮細胞および血清を用い、MPO完全freeの条件で、mGECを培養し、MPO-ANCAの作用がMPOを介しているかを検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、国立感染症実験動物計画委員会の承認を得て、動物愛護の指針にもとづいて行った。

C. 研究結果

1. MPO-ANCAによる内皮障害解析:

血管内皮接着分子(ICAM-1)の発現を解

析した。anti-mMPOは、糸球体内皮細胞のICAM-1、VCAM-1、E-selectinの発現を誘発した(図2)。

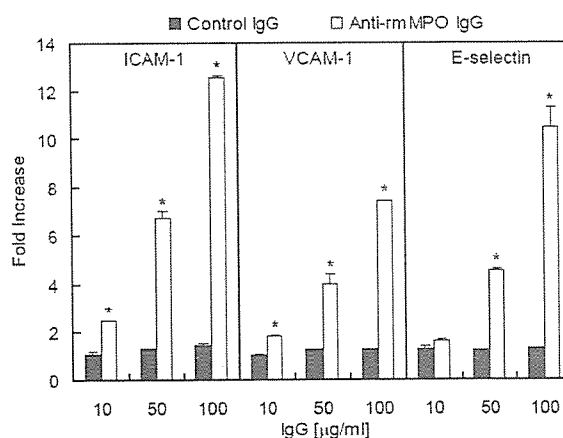


図2. Anti-MPO抗体によるmGECのadhesion moleculesの発現

2. ICAM-1のmRNA発現:

ICAM-1のmRNAの発現の上昇を認めた(図3)。



*N: non treatment,
C: control IgG,
AM: anti-mMPO stimulation

図3. mGECのICAM-1のmRNA発現

3. サイトカイン定量:

MPO-ANCAによる内皮細胞障害に関与するサイトカインを18種類サイトカインを定した結果、anti-mMPOは、糸球体内皮細胞のKCケモカインの産生の顕著な増加を認めた(図4)。

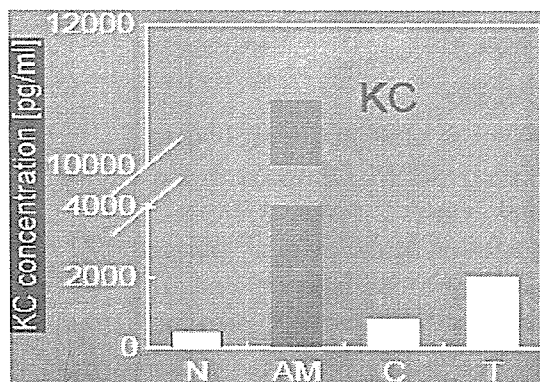


図4. mGECのKC産生

N:無刺激、A:antiMPO、C: IgG、T: TNF- α

4. 活性化好中球による内皮障害:

MPO-ANCA の作用に活性化好中球が関与するかを検討し、N-acetylcysteine (NAC) の抑制によって抑制された。(図5)

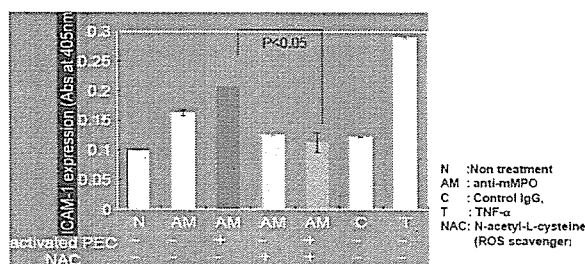


図5. mGECの活性化好中球による障害

5. MPOの関与:

anti-mMPO は、糸球体内皮細胞の ICAM-1 発現と KC ケモカインの産生増加は、MPO-KO を使用した MPO 完全不含の系でも同様に認められ、抗原である MPO と無関係に内皮細胞に反応することが明らかになった。

D. 考察

急速進行性糸球体腎炎の炎症初期に起こる血管傷害に機構における MPO-ANCA の役割を明らかにするため、マウス糸球体から血管内皮細胞を採取し、その初代培養を用いて、活性化好中球の糸球体内皮細胞(mGEC)への作用を解析した。MPO-ANCA

の mGEC へ直接作用は、MPO-KO マウスの血清と mGEC を用いて解析した結果、anti-mMPO は、糸球体内皮細胞の ICAM-1 発現と KC ケモカインの産生増加を誘発した。ICAM-1 発現は、MPO-KO を使用した MPO 完全不含の系でも同様に認められ、抗原である MPO と無関係に内皮細胞に反応することが明らかになった。また、また、好中球由来の活性酸素を抑制することで ICAM-1 および KC 産生量は減少した。以上から、血管炎の発症は、MPO-ANCA は、好中球への作用に加え、直接血管内皮細胞にも結合して ICAM-1 の発現を上昇させ、KC ケモカインを放出し、活性化した好中球が MPO および活性酸素を産生することで、組織にとどまって二次的な血管内皮細胞障害を起こすことが考えられる。

尚、本研究は、発表者のほか、中山俊憲千葉大・院医教授の教室との共同研究によって行った。

E. 結論

MPO 抗体は、糸球体内皮細胞の ICAM-1 発現と KC ケモカインの産生増加を誘発した。ICAM-1 発現は、MPO-KO を使用した MPO 完全不含の系でも同様に認められ、抗原である MPO と無関係に内皮細胞に反応した。anti-mMPO と活性化好中球の刺激により ICAM-1 および KC の産生量は最も高く、その活性酸素を抑制することで ICAM-1 および KC 産生量は減少した。これらの結果は、MPO-ANCA は、好中球への作用に加え、直接血管内皮細胞にも結合して ICAM-1 の発現を上昇させ、KC ケモカインを放出し、活性化した好中球が MPO および活性酸素を産生することで、組織にとどまって二次的な血管内皮細胞障害を起こすことが考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Akiko Ishida-Okawara, Noriko Nagai-Miura, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Akinori Okumura, Hitoshi Tachikawa, Shin-ichiro Kashiwamura, Haruki Okamura, Naohito Ohno, Hidechika Okada, Peter. A. Ward, **Kazuo Suzuki**. Neutrophil activation and induced by *C. albicans* water-soluble mannoprotein- β -glucan complex (CAWS). Exp. Mol. Pathol. in press..
2. Tomokazu Nagao, Mimiko Matsumura, Ayako Mabuchi, Akiko Ishida-Okawara, Osamu Koshio, Haruyuki Minamitani, and **Kazuo Suzuki**. Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody. Nephrol. Dialysis Transplant. 22: 77-87, 2007.
3. Shinohara Hiroyasu Nagai-Miura Noriko Ishibashi Ken-ichi, Adachi Yoshiyuki Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Shiro Naoe, **Kazuo Suzuki**, and Naohito Ohno. Beta-mannosyl linkages negatively regulate anaphylaxis and vasculitis in mice, induced by CAWS, fungal PAMPs composed of mannoprotein-beta-glucan complex secreted by *Candida albicans*. Biol. Pharm. Bull. 29: 1854-1861, 2006.
4. Shouichi Fujimoto, Shigehiro Uezono, Shuichi Hisanaga, Keiichi Fukudome, Shigeto Kobayashi, **Kazuo Suzuki**, Hiroshi Hashimoto, Hiroyuki Nakao, Hiroyuki Nunoi. Incidence of ANCA-associated primary renal vasculitis in Miyazaki Prefecture: The first population-based, retrospective epidemiological survey in Japan. Clinical Journal of American Society of Nephrology. 1: 1016-1022, 2006.
5. Yasuaki Aratani, Fumiaki Kura, Haruo Watanabe, Hisayoshi Akagawa, Yukie Takano, Akiko Ishida-Okawara, **Kazuo Suzuki**, Nobuyo Maeda, and Hideki Koyama. Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defense against *Cryptococcus neoformans*. J. Med. Microbiol. 55: 1291-1299, 2006.
6. A. S. Persad, Y. Kameoka, S. Kanda, Y. Niho, **K. Suzuki**. Arginine to Cysteine Mutation (R499C) Found in a Japanese Patient with Complete Myeloperoxidase Deficiency. Gene Expression 13: 67-71, 2006.
7. N. Nagai-Miura, T. Harada, H. Shinohara, K. Kurihara, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S., Naoe, **K. Suzuki** and N. Ohno. Lethal and severe coronary arteritis in DBA/2 mice induced by fungal Pathogen, CAWS, *Candida albicans* water-soluble fraction. Atherosclerosis 186: 310-320, 2006.

2. 学会発表

国際会議

1. Nozu T, Matsumura M, Nagao T, Kobayashi M, Okawara A, Hasegawa A, Nakayama T, Nagai A, Suzuki K
Function of the primary pulmonary endothelial cells associated with activated neutrophils. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
2. Kobayashi M, Matsumura M, Nagano T, Hoshino A, Okawara A, Aratani Y, Minamitani H, Suzuki K
3. Glomerular endothelial cell activation in vasculitis Induced by anti-myeloperoxidase antibody and activated neutrophils. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
4. Tachikawa H, Okawara O, Suzuki K.
Contribution of the systemic, splenic, and renal Th2 responses to the developing glomerulonephritis in NCA-associated crescent-forming glomerulonephritis mice. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
5. Tomizawa K, Suzuki R, Tanokura M, Suzuki K. Analysis of MPO-ANCA Binding Site of MPO Molecule Surface Regions. June 18-23, 2006
6. Hoshino A, Nagao T, Tokunaka K, Okawara A, Ihara T, Uno K, Muso E, Miura N, Ohno N, Yasuhara M, Yamamoto K, Suzuki K
Myeloperoxidase (MPO) on Activation Neutrophils and anti-MPO Antibody involve the Initiation of Glomerulonephritis and Vasculitis induced by *Candida albicans* Glycoprotein. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
7. Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Okawara A,

Suzuki K, Maeda N, and Koyama H. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense against fungal infection. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006

国内会議

1. 永井厚志、近藤光子、野津朋子、鈴木和男 間質性肺炎における ANCA 陽性例の Prevalence と病態 第 103 回日本内科学会総会・年次講演会 (横浜) 4 月 14-16 日
2. 太刀川仁、Mahmoud Ramadan、小玉 誠、大川原明子、三間 渉、伊藤正洋、柏村 健、広野 暁、鈴木和男、相澤義房 冠動脈疾患患者における MPO-ANCA の挙動 第 103 回日本内科学会総会・年次講演会 (横浜) 4 月 14-16 日
3. 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、高野幸枝、大川原明子、鈴木和男、小山秀機 クリプトコッカス感染防御におけるミエロペルオキシダーゼの関与 第 27 回関東医真菌懇話会 (東京) 5 月 27 日
4. 鈴木和男 活性化好中球と MPO-ANCA による糸球体内皮細胞傷害 第 49 回日本腎臓学会学術総会 シンポジウム「ANCA 関連血管炎の病理と臨床」(東京) 6 月 14-16 日、
5. 小林美登里、松村実美子、長尾朋和、荒谷康昭、星野昭芳、大川原明子、山本健二、南谷晴之、鈴木和男 血管炎発症に関わる MPO-ANCA は直接糸球体内皮細胞へ作用する 第 17 回日本生体防御学会学術集会 (札幌) 7 月 27-29 日
6. 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、大川原明子、鈴木和男、小山秀機 クリプトコッカス感染防御における MPO-H2O2-Cl 系の関与 第 12 回 MPO 研究会 (大阪) 9 月 22-23 日
7. 原田敏江、三浦典子、安達禎之、Keiko Ozato、鈴木和男、大野尚仁 CAWS 血管炎における IRF-8 の役割 第 12 回 MPO 研究会 (大阪) 9 月 22-23 日
8. 大川原明子、三浦 典子、大原関利章、高橋啓、岡田秀親、大野尚仁、鈴木和男 CAWS 培養条件の違いによる好中球活性化への影響 第 12 回 MPO 研究会 (大阪) 9 月 22-23 日
9. 三浦典子、安達禎之、大原関利章、高橋啓、大川原明子、鈴木和男、大野尚仁 各種マウス系統を用いた CAWS 血管炎発症に関する遺伝的素因の解析 第 12 回 MPO 研究会 (大阪) 9 月 22-23 日
10. 駒井元彦、高野雄介、三浦典子、安達禎之、鈴木和男、大野尚仁 CBA/J, CBA/N マウスにおける CAWS 血管炎の検討 第 12 回 MPO 研究会 (大阪) 9 月 22-23 日
11. Suzuki K, Nauseef W ミエロペルオキシダーゼ(MPO)の生体防御における役割 第 12 回 MPO 研究会 (大阪) 9 月 22-23 日
12. 高橋啓、大原関利章、山田仁美、三浦典子、大野尚仁、村山研、野津朋子、松村実美子、大川原明子、鈴木和男、新井孝夫、荒谷康昭 CAWS 誘発血管炎モデルにおける合成免疫グロブリン(SyIG)の血管炎抑制作用 第 12 回 MPO 研究会 (大阪) 9 月 22-23 日
13. 星野昭芳、猪原登志子、宇野賀津子、武曾恵理、山本健二、鈴木和男 抗 MPO 抗体誘導マウス全身血管炎モデルにおける活性化好中球からのサイトカイン産生 第 12 回 MPO 研究会 (大阪) 9 月 22-23 日
14. 富澤一夫、大川原明子、雑賀寛、田之倉優、鈴木和男 急性進行性糸球体腎炎モデル SCG/Kj マウスの MPO-ANCA 病因エピトープは治療により減少する 第 12 回 MPO 研究会 (大阪) 9 月 22-23 日
15. 星野昭芳、山本健二、鈴木和男 抗 MPO 自己抗体誘導マウス全身血管炎モデルにおける抗体の挙動を蛍光ナノ粒子標識 QD 抗 MPO 抗体でイメージングする 第 15 回 バイオイメージング学会 (盛岡) 10 月 31 - 11 月 2 日
16. Ishida-Okawara A., Nagi-Miura N., Oharaseki T., Takahashi K., Okada H., Ohno N., and Suzuki K. Neutrophil Activation by CAWS in Different Cultured Condition」(CAWS 調整時の異なった菌の培養条件による好中球活性化の相違) 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪) 12 月 11 - 13 日
17. Hoshino, A., Okawara, A., Yamamoto, K., and Suzuki K. 星野昭芳、大川原明子、山本健

- 二、鈴木和男 Activated neutrophils produce IL-17 and IL-23 by MPO-ANCA in Candida albicans-derived mannoprotein-induced murine systemic (カンジダ由来マンノプロテイン誘導のマウス全身性血管炎における MPO-ANCA によって活性化された好中球が IL-17 と IL-23 を産生) 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪) 12 月 11 - 13 日
18. 三浦典子、安達禎之、大原関利章、高橋啓、大川原明子、鈴木和男 CAWS 血管炎の発

症と重篤かに関わる遺伝的素因の各種マウス系統を用いた解析 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪) 12 月 11 - 13 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

日本人顕微鏡的多発血管炎の疾患感受性遺伝子に関する研究

分担研究者 土屋尚之 筑波大学大学院人間総合科学研究科社会環境医学専攻教授

研究協力者 宮下リサ、豆ヶ野剛一、徳永勝士

東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野

川崎 綾 筑波大学大学院人間総合科学研究科

黒木喜美子、前仲勝実 九州大学生体防御医学研究所構造生物学

Marco Colonna Washington University

小林茂人、橋本博史 順天堂越谷病院内科

尾崎承一 聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科

研究要旨

Leukocyte Ig-like receptor (LILR) A2 の第 6 イントロン・スプライス受容部位に位置する SNP が、全身性エリテマトーデス(SLE), 顕微鏡的多発血管炎(MPA)と有意に関連することが見出された。関連アリルでは、9 アミノ酸下流のスプライス受容部位が利用され、リンカー部分の 3 アミノ酸が欠失したアイソフォームが産生される。このアイソフォームも、通常型同様、単球細胞表面に表出されていることが確認された。また、I 型インターフェロンや炎症性サイトカインの誘導因子であり、欧米において SLE との関連が注目されている interferon regulatory factor (IRF) 5 多型が、統計学的有意差には到達しないものの、MPA とも関連する傾向が検出された。

A. 研究目的

われわれは、日本人顕微鏡的多発血管炎(MPA)の疾患感受性探索をおこない、これまでに、*HLA-DRB1*0901-DQB1*0303* ハプロタイプ、および、抑制シグナルが優位になると推測される *KIR* と *HLA-class I* との組み合わせが疾患感受性に関連することを見出し、感染抵抗性の減弱が病院に関与する可能性を提唱した。

本年度は、昨年度開始した、第 19 染色体に *KIR* と隣接して多重遺伝子ファミリーを形成して存在する leukocyte Ig-like receptor (*LILR*) 遺伝子ファミリーのうちで、好酸球、好塩基球、単球、血管内皮細胞などにおける発現が見られる活性化型受容体である *LILRA2* (*LILRA2*, *ILT1*, *LIR7*) の解析を継続するとともに、新規の候補遺伝子として、interferon α , β 、および、IL-6, IL-12, TNF α などの炎症性サイトカインの誘導に重要な因子であり、近年、全身性エリテマトーデス(SLE)との関連が注目されている interferon regulatory factor 5

(*IRF5*)と MPA との関連を検討した。

B. 研究方法

LILRA2 については、データベースに登録された、第 6 イントロンのスプライス受容部位のコンセンサス・モチーフを置換する SNP (rs2241524)につき、関連解析を施行するとともに、スプライシングに与える影響を、末梢血単核球の RT-PCR 産物のシーケンシングにより解析した。

また、各遺伝子型の健常者における末梢血単核球表面における *LILRA2* の発現を、フロー・サイトメトリーにて検討した。

IRF5 については、欧米集団において SLE との関連が報告された、第 1 イントロンに新規スプライス部位を作り出す SNP(rs2004640)およびその近傍に見出された SNP を MPA との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、平成 11 ~ 13 年度の研 究班において多施設共同研究により収集

され、連結不可能匿名化された形で保管されていた検体を、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年3月29日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に則り、「遺伝子研究の同意を得た既収集匿名検体(A群試料)」として本研究において使用するための研究計画の承認を東京大学大学院医学系研究科ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会に得た上で施行した。

C. 研究結果

LILRA2の第6イントロンに位置し、スプライス受容モチーフを消失させる SNP(rs2241524)については、A/A 遺伝子型が SLE, MPA において有意に増加していたが、RA では関連は認められなかった(表1)。

各遺伝子型の健常ドナーの末梢血単核球の RT-PCR 産物のシーケンシングにより、このアレルでは、9塩基下流の AG をスプライス・アクセプターとしたスプライシングがおこる結果、リンカー部分の3アミノ酸を欠失した蛋白($\Delta 419-421$)に翻訳されることが推測された。また、A/A 遺伝子型では100%がこのスプライシングを受け、G/G 遺伝子型では100%通常型のアイソフォームが産生されることが見出された(図1)。

次に、 $\Delta 419-421$ アイソフォームが、細胞表面に表出されるか否かを、G/G, A/A それぞれ2名の末梢血単核球を用いたフロー・サイトメトリーにより検討した。いずれの遺伝子型においても、CD14 陽性分画に LILRA2 の染色が見られたことから、このアイソフォームは細胞表面に表出されることが示された(図2)。

IRF5については、SLE との関連が報告された rs2004640 およびその6 bp 下流の SNP について、統計学的有意差には到達しなかったものの、SLE 同様の関連の傾向が認められた(表2)。

D. 考察

いずれの遺伝子においても、MPA において、SLE と同様の関連あるいはその傾

向が認められたことは、両疾患の病因に一部共通する部分があることを示唆する。LILRA2 は FcR γ と会合して細胞表面に表出されるが、 $\Delta 419-421$ により、大きな構造変化や FcR γ との会合が不可能になることにより、細胞表面に表出されなくなるという可能性は否定された。今後、この3アミノ酸の欠失による機能的な影響を明らかにする必要がある。

IRF5 については、オッズ比としては SLE に匹敵する関連が検出されているが、試料数が少ないために、統計学的有意差に到達しておらず、今後、より多数検体を用いた検証が必要である。また、MPA の病因・病態における type I interferon 系につき、今後の検討が期待される。

E. 結論

LILRA2 リンカー部分の3アミノ酸欠失をもたらす多型と MPA との関連が検出された。このアイソフォームも、通常型同様、末梢血単球表面に発現することが確認された。また、IRF5 の SLE 関連多型に、MPA においても関連の傾向が観察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsuchiya N, Kobayashi S, Hashimoto H, Ozaki S, Tokunaga K: Association of *HLA-DRB1*0901-DQB1*0303* haplotype with microscopic polyangiitis in Japanese. *Genes Immun* 7:81-84, 2006.
- 2) Miyashita R, Tsuchiya N, Yabe T, Kobayashi S, Hashimoto H, Ozaki S, Tokunaga K: Association of killer cell immunoglobulin-like receptor (*KIR*) genotypes with microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum* 54:992-997, 2006.
- 3) Okaji Y, Tsuno NH, Kitayama J, Sakurai D, Tsuchiya N, Saito S, Takegami K, Tsuchiya T, Kawai K, Yazawa K, Asakage M, Yoneyama S, Yamada J, Tokunaga K, Takahashi K, Nagawa H: Effects of Id (inhibitor of DNA binding / differentiation) gene down-regulation in

- human colorectal cancer cells on early steps of haematogenous metastasis. *Eur J Cancer* 42:668-673, 2006.
- 4) Tsuchiya N, Honda Z, Tokunaga K: Role of B cell inhibitory receptor polymorphisms for systemic lupus erythematosus: a negative times a negative makes a positive. *J Hum Genet* 51: 741-750, 2006.
 - 5) Furuya T, Hakoda M, Ichikawa N, Higami K, Nanke Y, Yago T, Kobashigawa T, Tokunaga K, Tsuchiya N, Kamatani N, Kotake S. Differential association of HLA-DRB1 alleles in Japanese patients with early rheumatoid arthritis in relationship to autoantibodies to cyclic citrullinated peptide. *Clin Exp Rheumatol* (in press)
 - 6) Hitomi Y, Tsuchiya N, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Tokunaga K, Sato S: Association of human *CD22* gene polymorphism with susceptibility to limited cutaneous systemic sclerosis. *Tissue Antigens* (in press)
 - 7) Kawasaki A, Tsuchiya N, Ohashi J, Murakami Y, Fukazawa T, Kusaoi M, Matsuta K, Hashimoto H, Tokunaga K. Role of *APRIL (TNFSF13)* polymorphisms in the susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. *Rheumatology* (in press)
 - 8) Tsuchiya N, Kyogoku C, Miyashita R, Kuroki K: Diversity of human immune system multigene families and its implication in the genetic background of rheumatic diseases. *Curr Med Chem* (in press)
 - 9) 土屋尚之: TOPICS: TNF阻害薬抵抗性の関節リウマチに対する abatacept (CTLA4-Ig)の有効性. *内科* 97:735-737, 2006.
 - 10) 土屋尚之: 関節リウマチ重症度と関連する免疫系機能遺伝子多型. *リウマチ科* 36:294-298, 2006.
 - 11) 土屋尚之、宮下リサ: 顕微鏡的多発血管炎の疾患感受性とKIR-HLA遺伝子相互作用. *リウマチ科* 36:514-521, 2006.
 - 12) 土屋尚之: 全身性エリテマトーデスのゲノム医学. 「臨床ゲノム科学入門」(永井良三監修、徳永勝士、大木秀一、田中紀子編)杏林図書. pp.192-205, 2007.
 - 13) 土屋尚之: 全身性エリテマトーデス-疾患感受性遺伝子探索の最近の進歩-. *リウマチ科* 印刷中.
- ## 2. 学会発表
- 1) 土屋尚之: リウマチ性疾患の遺伝素因. 第42回宮城リウマチ外科研究会特別講演、2006年2月18日、仙台。
 - 2) 土屋尚之: 遺伝子多型解析に基づく全身性エリテマトーデス発症分子機序の検討(シンポジウム)。第50回日本リウマチ学会、2006年4月23日～26日、長崎(抄録集 p22)
 - 3) 宮下リサ、土屋尚之、小林茂人、橋本博史、尾崎承一、徳永勝士: 顕微鏡的多発血管炎(MPA)の疾患感受性におけるKIR (killer cell Ig-like receptor)-HLA 遺伝子間相互作用の検討。第50回日本リウマチ学会、2006年4月23日～26日、長崎(抄録集 p19)。
 - 4) 人見祐基、土屋尚之、長谷川稔、藤本学、竹原和彦、佐藤伸一、徳永勝士: ヒト *CD22* 遺伝子多型と全身性強皮症との関連。第50回日本リウマチ学会、2006年4月23日～26日、長崎(抄録集 p218)。
 - 5) 川崎綾、古川宏、土屋尚之、草生真規雄、深沢徹、松多邦雄、橋本博史、小野栄夫、徳永勝士: SH2D1A (SLAM-associated Protein) 遺伝子多型と若年発症全身性エリテマトーデスの関連。第50回日本リウマチ学会、2006年4月23日～26日、長崎(抄録集 p220)。
 - 6) 古谷武文、市川奈緒美、箱田雅之、樋上謙士、南家由紀、八子徹、小橋川剛、土屋尚之、徳永勝士、鎌谷直之、小竹茂: 早期 RA 患者における骨破壊の進行と HLA-DRB1 遺伝子型および抗 CCP 抗体との関連。第50回日本リウマチ学会、2006年4月23日～26日、長崎(抄録集 p122)。
 - 7) 土屋尚之: ヒト免疫系多重遺伝子ファミリー

一における copy number polymorphism と疾患感受性。日本進化学会 2006 年大会シンポジウム「多重遺伝子ファミリーの進化：遺伝子の生成と消滅のダイナミズム」。2006年8月29日～31日、東京(要旨集 p45)

- 8) 江原幸和、松下正毅、土屋尚之、柏瀬貢一、宮城徹、松多邦雄、草生真規雄、深沢徹、橋本博史、高崎芳成、佐竹正博、岡孝紀、徳永勝士：蛍光ビーズ法を用いた新規タイピングシステムによる *IL-10* 遺伝子プロモーター多型とリウマチ性疾患との関連の検討。日本組織適合性学会。2006年9月24～26日、東京。
- 9) 土屋尚之：遺伝子解析に基づくリウマチ・膠原病の病因・病態解析。日本人類遺伝学会シンポジウム。2006年10月17～20日、米子。(抄録集 p100)
- 10) 江原幸和、松下正毅、土屋尚之、柏瀬貢一、宮城徹、松多邦雄、草生真規雄、深沢徹、橋本博史、高崎芳成、佐竹正博、岡孝紀、徳永勝士：蛍光ビーズ法を用いた新規タイピングシステムによる *IL-10* 遺伝子プロモーター多型とリウマチ性疾患との関連の検討。日本人類遺伝学会。2006年10月17～20日、米子。(抄録集 p155)
- 11) Furuya T, Hakoda M, Ichikawa N, Higami K, Nanke Y, Yago T, Kobashigawa T, Inoue E, Tsuchiya N, Tokunaga K, Kamatani K, Kotake S. Differential

association of HLA-DRB1 alleles in Japanese patients with early rheumatoid arthritis in relationship to autoantibodies to cyclic citrullinated peptide. American College of Rheumatology 2006 Annual Scientific Meeting.

- 12) Kawasaki A, Tsuchiya N, Kyogoku C, Hashimoto H, Takasaki Y, Behrens, T.W., Tokunaga K. Association of interferon regulatory factor 5 (IRF) SNPs with systemic lupus erythematosus in Japanese. 2006年日本免疫学会総会、2006年12月11～13日、大阪(抄録集 p101)
- 13) 江原幸和、土屋尚之、松多邦雄、橋本博史、高崎芳成、徳永勝士：蛍光ビーズ法を用いた新規タイピングシステムによる *IL-10* 遺伝子プロモーター多型とリウマチ性疾患との関連の検討。2006年日本免疫学会総会、2006年12月11～13日、大阪(抄録集 p286)
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

表1 MPA, SLE, RA における *LILRA2* intron 6 スプライス受容部位多型の関連解析

<i>LILRA2</i>	MPA (n=50)		SLE (n=273)		RA (n=273)		健常対照群 (n=285)	
G/G	22	(44.0)	142	(52.0)	150	(54.9)	153	(53.7)
G/A	20	(40.0)	98	(35.9)	99	(36.3)	112	(39.3)
A/A	8	(16.0)	33	(12.1)	24	(8.8)	20	(7.0)

A/A と (G/G + G/A)との比較

MPA: オッズ比(OR) 2.52, 95%信頼区間(CI) 1.07-5.95, $P = 0.049$

SLE: OR 1.82, 95%CI 1.02-3.24, $P = 0.041$

表2 MPA および SLE における *IRF5* intron 1 SNP

	SLE (n=273)		MPA (n=50)		健常対照群 (n=203)	
rs2004640						
G/G	114	(41.2)	20	(40.0)	102	(50.2)
G/T	133	(48.0)	28	(56.0)	81	(39.9)
T/T	30	(10.8)	2	(4.0)	20	(9.9)
T+	163	(58.8) ^{*1}	30	(60.0) ^{*4}	101	(49.8)
T	193	(34.8)	32	(32.0)	121	(29.8)
-3829						
C/C	206	(74.3)	36	(72.0)	132	(65.0)
C/G	70	(25.3)	13	(26.0)	66	(32.5)
G/G	1	(0.4)	1	(2.0)	5	(2.5)
G+	71	(25.6) ^{*2}	14	(28.0) ^{*5}	71	(35.0)
G	72	(13.0) ^{*3}	15	(15.0) ^{*6}	76	(18.7)

SLE vs control: ^{*1} OR=1.44, 95%CI: 1.00-2.08, $P=0.048$, ^{*2} OR=0.64, 95%CI: 0.43-0.95, $P=0.027$, ^{*3} $P=0.015$

MPA vs control: ^{*4} OR=1.51 95%CI: 0.81-2.84, $P=0.19$, ^{*5} OR=0.72, 95%CI: 0.37-1.43, $P=0.35$, ^{*6} $P=0.39$

ゲノム DNA

エクソン 6

エクソン 7

G アリル.....TCTCAG GTGAG TCCAG CATCCCTAG GCCAACA.....
A アリル.....TCTCAG GTGAG TCCA**A** CATCCCTAG GCCAACA.....

cDNA

AlaSerLeuGly

G アリル.....TCTCAGCATCCCTAGGCCAACA.....
A アリル.....TCTCAG-----GCCAACA.....
Gly

図1 *LILRA2* intron 6 スプライス受容部位の多型(rs2241524)によるスプライシングの変化と、3アミノ酸欠失

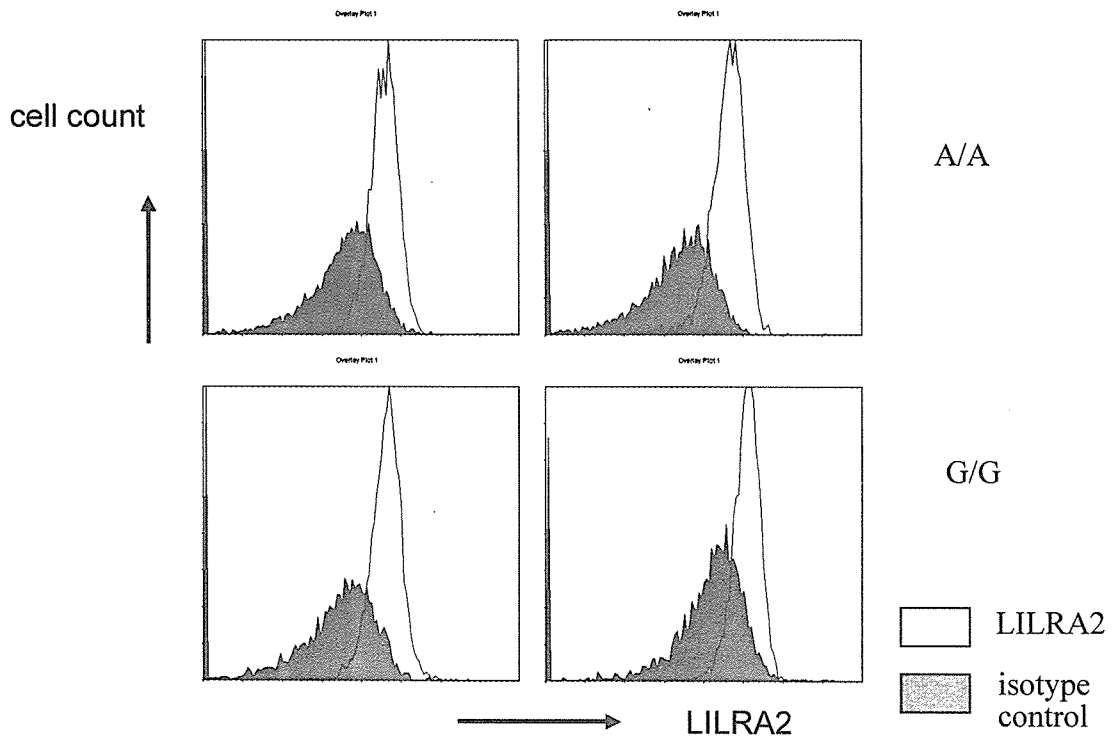


図2 *LILRA2* rs2241524 G/G および A/A 遺伝子型の健常者各2例の末梢血単球 *LILRA2* 発現。

膠原病関連組換え近交系 MXH/lpr マウスと AlphaScreen 法を組合わせた
high-throughput な病態特異的新規自己抗体の検索

分担研究者 能勢真人 愛媛大学大学院医学系研究科ゲノム病理学分野 教授
研究協力者 小森浩章 愛媛大学大学院医学系研究科ゲノム病理学分野
澤崎達也 愛媛大学無細胞科学生命工学研究センター 助教授
遠藤弥重太 愛媛大学無細胞科学生命工学研究センター 教授

研究要旨

膠原病関連組換え近交系 MXH/lpr マウスを対象に、無細胞蛋白質合成系と AlphaScreen 法を組み合わせ、膠原病病態関連新規自己抗体の検出を試みた。これまでに解明した膠原病病態に関連する感受性遺伝子座をもとに、位置的候補として 120 個の合成蛋白質を作製し解析したところ、血管炎病態と有意な相関を示す 5 つの新規自己抗体を発見した。本手法は、high-throughput に病態特異的新規自己抗体を検索でき、しかも自己抗体の検出が直ちに対応抗原の同定につながるという利点があり、今後血管炎病態を解析する上で新たな知見を提供しうる有用な手法であることが明らかになった。

A. 研究目的

これまで膠原病関連組換え近交系 MXH/lpr マウスを用い、血管炎病態と MPO-ANCA を始めとする複数の自己抗体と血管炎病態との関連を解析したが明らかな相関は認められていない。

無細胞蛋白質合成系は愛媛大学無細胞生命工学研究センターによって確立された手法で、コムギ胚芽から抽出したリボゾームを用い、cDNA から直接、短時間、高収量で全自動に蛋白質を合成可能である。また、PCR 法を用いて biotin を始めとする様々な Tag ligation site を容易に付加することができる。一方 AlphaScreen 法はそれぞれ異なった蛍光色素を練り込んだ donor bead と acceptor bead を用い、分子間相互作用を解析するシステムで、従来の ELISA 法と比べ高感度・迅速・機械化可能という利点がある。

今回我々は streptavidin coat donor bead、protein A conjugated acceptor bead と biotin 融合合成蛋白質を用いた新規自己抗体検出系を確立した(図 1)。この手法は、一度に多数(～数百個)の合成蛋白質を対象に、血清中の自己抗体価を high-throughput に

解析でき、しかも自己抗体の検出が対応抗原の同定に直結する。膠原病病態と自己抗体との関連を解明する上で有用な手法と考えられる。

B. 研究方法

1. 我々が同定した膠原病関連感受性遺伝子座近傍の 120 個の遺伝子について網羅的にビオチン融合蛋白質を合成し、MXH/lpr と親系統あわせて 11 系統の血清を対象として AlphaScreen 法を用いた新規自己抗体の検索を行った。
2. MXH/lpr 各系統の腎血管炎 score と AlphaScreen 法により観察されたシグナル強度(≒自己抗体価)との相関について統計学的に解析した。
3. 測定された自己抗体の profile を見るため、階層的クラスター解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は愛媛大学動物実験指針に基づいて行った。

C. 研究結果

120 個の合成蛋白質のうち 5 個(雌 1 個、

雄 4 個)について、測定された自己抗体価と血管炎病態が有意な相関を示すことが明らかとなった。

階層的クラスター解析の結果、これらの自己抗体は隣接してクラスタリングされた(図 2)。

D. 考察

本手法は無細胞蛋白質合成系と AlphaScreen 法を組み合わせることにより、多数(数百個)の合成蛋白質を対応抗原とし、血清中の反応抗体(自己抗体)の有無を high-throughput に検索できる。これは、ゲノム情報あるいは蛋白質の機能に基づいた「網羅的」自己抗体の検索を可能とする。実際我々は感受性遺伝子座に基づいた位置的候補として 120 個の蛋白質を対象に解析を行い、血管炎を始め様々な膠原病病態と相関すると思われる多数の自己抗原を検出した。本手法のもう一つの利点として、「反応抗体の検出=対応抗原の同定」である点が挙げられ、また合成蛋白質を用いた ELISA 法の構築や合成蛋白質投与による抗体作製へと容易に進むことができる。これらの特長により、本手法は膠原病病態と自己抗体の関連について新たな知見を提供しうる有用なツールになりうると考えられる。

E. 結論

1. 無細胞タンパク質合成系と AlphaScreen 法を組み合わせた新たな自己抗体検索法を確立した。

2. 120 個の合成蛋白質を対象に MXH/lpr と MRL/lpr、C3H/lpr 計 11 系統の血清について検索したところ、5 個の蛋白質(雌 1 個、雄 4 個)に対する自己抗体について、抗体価と血管炎病態との相関関係が観察された。

3. 本手法は high-throughput な病態特異的新規自己抗体の検索に有用である。

共同研究者：

曾我美子(愛媛大学大学院医学系研究科ゲノム病理学分野)、森士朗(東北大学大学院歯学研究科顎顔面口腔外科学講座)

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Zhang MC, Misu N, Furukawa H, Watanabe Y, Terada M, Komori H, Miyazaki T, Nose M, Ono M.: An epistatic effect of the female specific loci on the development of autoimmune vasculitis and antinuclear autoantibody in murine lupus. *Ann Rheum Dis*, 65: 495-500, 2006

2. Yoshida M, Saiga K, Hato T, Iwaki S, Niiya T, Arita N, Komori H, Tsubaki T, Furukawa H, Terada M, Maeyama K, Nemoto K, Nose M, Ono M.: Cappuccino mutation in an autoimmune-prone strain of mice suggests a role of platelet function in the progression of immune complex crescentic glomerulonephritis. *Arthritis Rheum*, 54: 2934-43, 2006.

3. Komori H, Furukawa H, Mori S, Ito MR, Terada M, Zhang MC, Ishii N, Sakuma N, Nose M, Ono M.: A signal adaptor SLAM-associated protein regulates spontaneous autoimmunity and Fas-dependent lymphoproliferation in MRL-Fas^{lpr} lupus mice. *J Immunol*, 176: 395-400, 2006.

4. Hasegawa H, Inoue A, Kohno M, Muraoka M, Miyazaki T, Terada M, Nakayama T, Yoshie O, Nose M, Yasukawa M. : Antagonist of interferon-inducible protein 10/CXCL10 ameliorates the progression of autoimmune sialadenitis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum*. 54:1174-83, 2006.

5. Muraoka M, Hasegawa H, Kohno M, Inoue A, Miyazaki T, Terada M, Nose M, Yasukawa M.: IK cytokine ameliorates the progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum*, 54: 3591-600. 2006.

2. 学会発表

1 宮崎龍彦、小森浩章、小野栄夫、能勢真人. : 糸球体腎炎感受性遺伝子座特異的コンジェニックマウスにおける糸球体腎炎発症の解析、第 95 回日本病理学会総会、東京、2006.4.30-5.2

2 Mori S, Tanda N, Ito MR, Tsubaki T,

Komori H, Oishi H, Zhang MC, Ono M, Nishimura M, Nose M.: A novel arthritis model causing ankylosis derived from a recombinant congenic mouse strain between MRL/lpr and C3H/lpr crosses. 5th International Congress on Autoimmunity, Nov. 29- Dec. 3, 2006, Sorrento, Italy

3 Lu LM, Nakatani K, Terada M, Miyazaki T, Arita N, Zhan MC, Furukawa H, Ono M, Hiai H, Nose M. Dominant resistant loci to lupus nephritis involving CD59a in a wild type mice-derived inbred strain MSM/Ms. 5th International Congress on Autoimmunity, Nov. 29- Dec. 3, 2006, Sorrento, Italy

4 Komori H, Soga Y, Sawasaki T, Endo Y,

Nose M.: Autoantibody-proteomics in autoimmune disease-prone recombinant inbred strains of mice using a novel high-throughput detection system. 5th International Congress on Autoimmunity, Nov. 29- Dec. 3, 2006, Sorrento, Italy

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1 Biotin融合蛋白質とAlphaScreen法を用いた自己抗体検出の原理

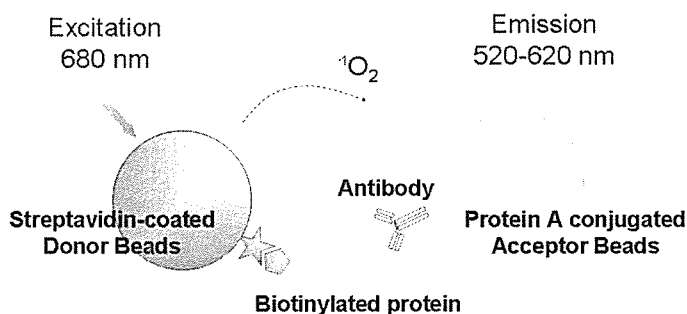
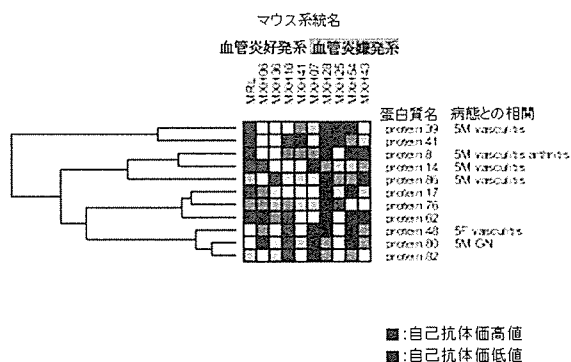


図2 階層的クラスター解析による自己抗体プロファイル(5ヶ月齢雄)



【大型血管炎の臨床研究分科会】

虚血肢に対する HGF プラスミドを用いた血管新生療法の治療成績

分担研究者 重松 宏 東京医科大学外科学第二講座主任教授

研究要旨

Buerger 病による重症虚血肢に対する HGF プラスミドを用いた一般臨床試験成績では、虚血性潰瘍の縮小や安静時疼痛の改善が 10 例中 7 例に認められ、一定の有用性が示された。血中 HGF 濃度や安全性についても、特記すべき病的意義のある上昇や有害事象を認めなかった。

A. 研究目的

重症虚血肢に対する HGF プラスミド (AMG0001, アンジェス MG (株)) を用いた臨床試験は、閉塞性動脈硬化症についてはプラセボ対照無作為化二重盲検比較試験を、Buerger 病については一般臨床試験で行われてきたが、Buerger 病についての治療成績を検討した。

B. 研究方法

Buerger 病の診断基準に基づいて確定診断された Buerger 病による動脈病変のため、虚血性潰瘍を有している 20 歳以上 85 歳未満のもので、既存の内科的治療や処置を 4 週間以上（観察期間）行っても投与対象肢の症状の改善が認められないものを対象とした。

AMG0001 を 2.5mg/mL, 1.85mL/バイアル含有する注射剤を生理食塩水で希釈し、投与対象肢の虚血部位に対して 1 部位あたり 0.5mg ずつ 8 部位（合計 4mg）に筋肉内投与した。投与は 4 週間の間隔をあけて 2 回行い、治療期 8 週間において改善傾向が認められない場合には、さらに

3 回目の投与を実施した。施注方法は一定の手順を定めて行った。

虚血性潰瘍は長径と短径を計測して、 $\sqrt{\text{長径} \times \text{短径}}$ で、安静時疼痛は VAS スケールを用いて評価した。

足関節部の上肢血圧比 (ABPI) および足趾動脈圧比 (TPI) を計測した。血管造影は IADSA を基本とし、MRA または CTA で代用することも可とした。

その他の血流動態の観察法として、皮膚灌流圧やアイソトープ検査、TcPO₂ など可能な場合に実施することとした。

胸部レントゲンや胸腹部 CT、頭部 MRI、上部消化管内視鏡、直腸診、マンモグラフィ、子宮頸部細胞診などを行って悪性腫瘍の存在を否定した。

参加施設は、北海道大学病院、旭川医科大学病院、日本医科大学病院、東京医科大学病院、東京大学医学部附属病院、東京医科歯科大学病院、愛知医科大学病院、川崎医科大学病院の 8 施設であった。

（倫理面への配慮）

患者本人から文書による同意書を得た。

C. 研究結果

1. 被験者の背景

男性 10 例、平均年齢 45.4 歳、に投与が行われた。全例喫煙歴があり、3 例は現在も喫煙中であった。罹病期間は、20 年以上のものが 2 例、10～20 年が 3 例、10 年未満が 5 例であった。投与は入院で 4 例に、外来で 6 例に行われた。

2. 潰瘍の大きさの推移 (図 1)

潰瘍の大きさの推移を変化率で、図 1 に示した。10 例中 7 例で潰瘍の縮小がみられた。中止は 3 例有り、1 例は、2 回の治験薬投与で改善がみられず 3 回投与を実施したが、悪化したため中止、1 例は潰瘍が感染兆候を認め早期の創処置が必要となったため、2 回目投与後治療期 6 週に中止、他の 1 例は、有害事象「疥癬」のために中止している。潰瘍が増悪した 1 例では、2 回の治験薬投与で改善がみられず 3 回投与を実施し、潰瘍は悪化しているが、鎮痛剤を増量したため VAS は見かけ上 6 週から改善していた。

3. 安静時疼痛の推移 (図 2)

安静時疼痛の推移を変化量で、図 2 に示した。10 例中 7 例で安静時痛は改善し、3 例では不変であった。先に述べたように、潰瘍が増悪したが VAS 値は低下したものが 1 例みられた。

4. 血中 HGF 濃度

血中 HGF 濃度は、疥癬を発症した 1 症例で上昇がみられたが、追跡調査で元の値に復していた。

5. 安全性

食道扁平上皮癌が 55 日後に、喉頭癌が 570 日後に認められたが、いずれも投与前から合併していたと考えられたもの

であった。その他、関連性を否定できないものとして、末梢性浮腫、白血球数減少、血中クレアチンホスホキナーゼ増加、血中カリウム増加、アラニン・アミノトランスフェラーゼ増加などがみられたが、病的意義は少なかった。

D. 考察

HGF プラスミドを用いた虚血肢治療は、閉塞性動脈硬化症や Buerger 病を対象に行われ、本年中にその成果が明らかにされると考えられる。Buerger 病については、7 例に潰瘍の縮小や安静時疼痛の改善が認められており、一般臨床試験ではあるが、一定の有用性が示されている。虚血肢や虚血心を対象とした血管新生療法は、骨髄細胞や末梢血幹細胞などを用いる細胞療法と並んで、種々のベクターを用いた遺伝子治療が試みられており、今後はこれらの治療法との比較対照などの検討が必要となろう。

E. 結論

HGF プラスミドを用いた Buerger 病による虚血肢治療では一定の有用性が示されたが、閉塞性動脈硬化症に対して行われているプラセボ対照無作為化二重盲検比較試験の結果と併せて評価する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当するものなし